

Metode *Reverse Transcriptase (RT)-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)* untuk identifikasi *Taura Syndrome Virus (TSV)* dan *Yellow Head Virus (YHV)*



Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi	1
3 Peralatan	2
4 Bahan	2
5 Prosedur kerja	3
 Tabel 1 - DNA <i>incubation mix</i>	 3
Tabel 2 - Komposisi larutan RT-PCR untuk mendeteksi TSV	4
Tabel 3 - Komposisi larutan RT-PCR untuk mendeteksi YHV	4



Prakata

Dalam rangka keberlanjutan usaha budidaya, meningkatkan produktivitas dan jaminan mutu komoditas perikanan budidaya serta memberikan hasil uji yang akurat bagi setiap pengujian laboratorium uji, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang Metode *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) untuk identifikasi *Taura Syndrome Virus* (TSV) dan *Yellow Head Virus* (YHV).

Standar ini disusun oleh Subpanitia Teknis 65-05-S2 Perikanan Budidaya, melalui konsensus pada tanggal 6 - 9 Nopember 2006 di Bogor, Jawa Barat yang dihadiri oleh anggota Subpanitia Teknis 65-05-S2 Perikanan Budidaya serta instansi terkait sebagai upaya untuk meningkatkan jaminan mutu dan keakuratan hasil uji dengan memperhatikan:

- 1 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
- 2 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke Wilayah Republik Indonesia.
- 3 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.

Standar ini juga telah melalui tahap jajak pendapat pada tanggal 21 Juni 2007 sampai dengan 21 September 2007 dan tahap pemungutan suara pada tanggal 12 Juni 2008 sampai dengan 12 Agustus 2008, namun untuk mencapai kuorum diperpanjang sampai dengan tanggal 12 September 2008 dan langsung disetujui menjadi RASNI.

Metode *Reverse Transcriptase (RT)-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)* untuk identifikasi *Taura Syndrome Virus (TSV)* dan *Yellow Head Virus (YHV)*

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan prosedur kerja metode *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)* untuk identifikasi *Taura Syndrome Virus (TSV)* dan *Yellow Head Virus (YHV)*.

2 Istilah dan definisi

2.1

annealing

proses pelekatan antara primer dengan *template*

2.2

denaturasi

proses pemisahan untai ganda DNA

2.3

DNA

asam deoksiribo nukleat, materi genetik yang berada di dalam inti sel organisme hidup

2.4

kontrol negatif

suatu kendali hasil suatu reaksi PCR dengan menggunakan *template* berupa akuades untuk mengetahui terjadinya suatu kontaminasi dari dalam pada pelaksanaan PCR

2.5

kontrol positif

suatu kendali hasil suatu reaksi PCR dengan menggunakan *template* berupa DNA yang sudah diketahui pasti berasal dari organisme target identifikasi

2.6

Polymerase Chain Reaction (PCR)

reaksi berantai polimerase, merupakan perbanyakan untai DNA panjang tertentu secara *in vitro* menggunakan enzim polimerase

2.7

primer

suatu *oligonukleotida* (nukleotida dengan panjang basa antara 20 - 30) digunakan sebagai awal sintesis DNA secara *in vitro*

2.8

RNA

asam ribonukleat, merupakan transkripsi DNA, RNA ada di dalam inti sel dan sitoplasma

2.9

RT-PCR

proses PCR yang didahului dengan sintesis DNA dari RNA menggunakan enzim transkrip balik (*reverse transcriptase*)

2.10

sentrifuse

alat untuk mengendapkan partikel dengan BM rendah dengan cara pemutaran pada kecepatan tinggi

2.11

supernatan

cairan jernih berada pada lapis atas setelah suatu larutan disentrifuse

2.12

template

cetakan, berupa oligonukleotida dengan panjang nukleotida antara 20 - 30, disalin dari satu DNA suatu organisme yang akan dilakukan perbanyakan secara laboratorium

3 Peralatan

- a) *fume hood*;
- b) sentrifuse;
- c) *vortex mixer*;
- d) *waterbath*;
- e) mikropipet;
- f) *laminar flow horizontal (biohazard)*;
- g) *thermal cycler*;
- h) elektroforesis horizontal;
- i) *uv transilluminator*;
- j) kamera.

4 Bahan

- a) SV RNA *Lysis buffer* yang mengandung BME;
- b) SV *Total RNA dillution buffer*;
- c) SV RNA *wash solution*;
- d) SV DNase *stop solution*;
- e) *yellow core buffer*;
- f) MnCl_2 0,09 M;
- g) DNase;
- h) alkohol 95 % (p.a);
- i) *nuclease free water*;
- j) 10 x PCR *buffer*;
- k) 50 mM MgCl_2 ;
- l) 200 μM dNTP mix;
- m) taq DNA *polymerase* (5U/ μl);
- n) AMV *reverse transcriptase*;
- o) RNase *inhibitor*;
- p) TSV *primer mix* .
primer 5195: 5' - TCA ATG AGA GCT TGG TCC – 3'
primer 9992: 5' - AAG TAG ACA GCC GCG CTT – 3'
product : 231 bp
- q) agarose;
- r) *ethidium bromide* (10 mg/ml);
- s) *loading buffer*;
- t) larutan TBE;
- u) 100 bp DNA *ladder*;
- v) akuades;

- w) *microtube*;
- x) *spin column*;
- y) isolasi DNA *phenol*;
- z) *using buffer*;
- aa) alkohol 70 %;
- bb) alkohol absolut;
- cc) *phenol* dalam *buffer*.

5 Prosedur kerja

5.1 Ekstraksi RNA (pada tahapan ini dapat menggunakan kit komersial)

Ekstraksi dilakukan terhadap sampel berupa jaringan, sedangkan sampel berupa *haemolymph* dapat langsung digunakan sebagai sampel RNA (Tabel 2).

- a) Masukkan 175 µl SV RNA *lysis buffer* (+BME) dalam *microtube* steril.
- b) Masukkan 0,2 g sampel jaringan yang telah digerus kemudian campur dengan cara membolak-balikkan *microtube*.
- c) Tambahkan 350 µl SV total RNA *dilution buffer* (larutan berwarna biru).
- d) Campur dengan membolak-balikkan tabung 3 kali - 4 kali.
- e) Panaskan dalam *waterbath* atau *heating block* dengan suhu 70 °C selama 3 menit.
- f) Sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm - 14.000 rpm selama 10 menit pada suhu ruang.
- g) Pindahkan supernatan ke dalam *microtube* baru.
- h) Tambahkan 200 µl alkohol 95 % (p.a) kemudian aduk dengan menggunakan pipet.
- i) Pindahkan campuran dalam *spin basket* kemudian lakukan sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm - 14.000 rpm selama 1 menit pada suhu ruang, buang cairan yang tertampung di bawah.
- j) Tambahkan 600 µl SV RNA *wash solution*.
- k) Sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm - 14.000 rpm selama 1 menit pada suhu ruang, buang cairan yang tertampung di bawah.
- l) Siapkan DNA *incubation mix* sesuai Tabel 1.

Tabel 1 - DNA *incubation mix*

No	Larutan	Satuan ukuran	Volume x Jumlah sampel = Total
1.	<i>yellow core buffer</i>	µl	40
2.	MnCl ₂	µl	5
3.	DNase	µl	5
CATATAN Campur dengan menggunakan pipet, jangan <i>divortex</i>			

- m) Tambahkan 50 µl DNase *mix* pada membran.
- n) Inkubasi selama 15 menit pada suhu kamar.
- o) Tambahkan 200 µl SV DNase *stop solution* (+*ethanol*) dan sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm - 14.000 rpm selama 1 menit pada suhu ruang.
- p) Tambahkan 600 µl SV RNA *wash solution*, sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm - 14.000 rpm selama 1 menit pada suhu ruang, kosongkan tabung bawah dengan cara dikibaskan satu kali.
- q) Tambahkan 200 µl SV RNA *wash solution*, sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm - 14.000 rpm selama 2 menit pada suhu ruang.
- r) Pindahkan *spin basket* pada tabung *elusi*.
- s) Tambahkan 100 µl *nuclease free water* pada membran, sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm - 14.000 rpm selama 1 menit pada suhu ruang.
- t) Contoh RNA siap digunakan atau disimpan pada suhu -20 °C (*freezer*).

5.2 Reaksi RT-PCR untuk deteksi TSV

- a) Komposisi larutan RT-PCR untuk deteksi TSV (25 µl/reaksi) dibuat dengan mencampurkan bahan-bahan sebagai berikut:

Tabel 2 - Komposisi larutan RT-PCR untuk mendeteksi TSV

No	Larutan	Satuan ukuran	Jumlah
1.	Akuabides steril	µl	18,125
2.	10 x PCR <i>buffer</i>	µl	2,5
3.	MgCl ₂	µl	2
4.	dNTP <i>mix</i>	µl	0,5
5.	TSV <i>primer mix</i>	µl	0,5
6.	<i>taq</i> DNA polymerase	µl	0,125
7.	RNAse <i>inhibitor</i>	µl	0,125
8.	AMV reverse transcriptase	µl	0,125
9.	sampel RNA	µl	1
Total volume		µl	25

- b) Siapkan bahan 1,1 x jumlah sampel.
 c) Campur semua bahan kecuali *template* RNA, bagikan ke dalam *microtube* 0,2 ml dengan volume masing-masing 24 µl.
 d) Tambahkan sampel RNA, termasuk kontrol negatif dan kontrol positif.
 e) Atur suhu pada *thermal cycler* sebagai berikut:
- untuk reaksi *reverse transcriptase*, *thermal cycler* diatur dengan suhu 42 °C selama 30 menit dan 94 °C selama 5 menit;
 - selanjutnya *thermal cycler* diatur dengan suhu denaturasi 95 °C selama 30 detik, suhu *annealing* 54 °C selama 30 detik, suhu *extention* 72 °C selama 1 menit. Proses PCR dilakukan sebanyak 32 siklus. Kemudian dilanjutkan dengan *extra extention* pada suhu 72 °C selama 7 menit. Setelah proses selesai sampel disimpan pada suhu 4 °C.

5.3 Reaksi RT-PCR untuk deteksi YHV

- a) Siapkan larutan RT-PCR untuk mendeteksi YHV (25 µl/reaksi) dengan mencampurkan bahan-bahan sebagai berikut:

Tabel 3 - Komposisi larutan RT-PCR untuk mendeteksi YHV

No	Larutan	Satuan ukuran	Jumlah
1.	akuades steril	µl	18,125
2.	10 x PCR <i>buffer</i>	µl	2,5
3.	MgCl ₂	µl	2
4.	dNTP <i>mix</i>	µl	0,5
5.	YHV <i>primer mix</i>	µl	0,5
6.	Taq DNA polymerase	µl	0,125
7.	RNAse <i>inhibitor</i>	µl	0,125
8.	AMV reserve transcriptase	µl	0,125
9.	sampel RNA	µl	1
Total volume		µl	25

- b) Siapkan bahan adalah 1,1 x jumlah sampel.
 c) Campur semua bahan, kecuali *template* DNA, kemudian bagikan ke dalam *microtube* 0,2 ml dengan volume masing-masing 24 µl.

- d) Tambahkan sampel RNA, termasuk kontrol negatif dan kontrol positif.
- e) Atur suhu pada *thermal cycler* sebagai berikut:
 - reaksi *reverse transcriptase*, *thermal cycler* diatur dengan suhu 42 °C selama 30 menit dan 94 °C selama 5 menit;
 - proses PCR, *thermal cycler* diatur dengan suhu denaturasi 95 °C selama 30 detik, suhu *annealing* 62 °C selama 30 detik, suhu *extension* 72 °C selama 1 menit. Proses PCR dilakukan sebanyak 32 siklus. Kemudian dilanjutkan dengan *extra extension* pada suhu 72 °C selama 7 menit. Setelah proses selesai sampel disimpan pada suhu 4 °C.

5.4 Pembacaan produk PCR pada gel agarose

5.4.1 Elektroforesis

- a) Masukkan 2 % gel *agarose* ke dalam elektroforesis *chamber*.
- b) Tambahkan larutan TBE ke dalam elektroforesis *chamber* hingga gel *agarose* terendam.
- c) Ambil sampel hasil PCR sebanyak 5 µl dan ditambah dengan *loading buffer* sebanyak 1 µl, campur dengan baik.
- d) Suntikkan ke dalam lubang sumuran dengan menggunakan mikropipet disertakan juga kontrol positif, kontrol negatif serta *marker* DNA masing-masing sebanyak 5 µl.
- e) Setelah semua sampel disuntikkan, pasang tutup elektroforesis *chamber* dan hidupkan listrik dengan voltase diatur 150 V.
- f) Setelah 30 menit, hentikan proses.

5.4.2 Pembacaan hasil

- a) Gel *agarose* kemudian direndam dalam larutan *ethidium bromide* (5 µg/ml) selama 5 menit.
- b) Selanjutnya gel *agarose* direndam dalam akuades selama 10 menit untuk menghentikan proses pewarnaan.
- c) Gel *agarose* diamati di atas UV *transilluminator*:
 - Hasil positif TSV bila terlihat perpendaran pita DNA dengan ukuran 230 bp.
 - Hasil negatif TSV bila tidak terlihat perpendaran pita DNA dengan ukuran 230 bp.
 - Hasil positif YHV bila terlihat perpendaran pita DNA dengan ukuran 270 bp.
 - Hasil negatif YHV bila tidak terlihat perpendaran pita DNA dengan ukuran 270 bp.
- d) Dokumentasikan hasil (informasi untuk dokumentasi hasil bisa disampaikan dengan membuat suatu contoh tabel *form* hasil).







BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : bsn@bsn.or.id